

JP07075579A

MicroPatent Report

DNA FRAGMENT CONTAINING GENE CODING DIAMINOPIMERIC ACID DECARBOXYLASE AND UTILIZATION THEREOF

[71] Applicant: MITSUBISHI CHEM

[72] Inventors: MADORI MIWA;
KOBAYASHI MIKI;
YUGAWA HIDEAKI

[21] Application No.: JP05223502

[22] Filed: 19930908

[43] Published: 19950320

1826426	TRIMMATT	CHANNETT	CLIFFORD	FRANK	22025	100
1826436	COLMAR	BAKER	DAVID	ROBERT	22026	100
1826446	TRIGGERS	TRINITT	BERNARD	ROBERT	22027	100
1826456	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22028	100
1826466	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22029	100
1826476	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22030	100
1826486	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22031	100
1826496	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22032	100
1826506	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22033	100
1826516	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22034	100
1826526	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22035	100
1826536	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22036	100
1826546	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22037	100
1826556	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22038	100
1826566	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22039	100
1826576	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22040	100
1826586	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22041	100
1826596	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22042	100
1826606	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22043	100
1826616	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22044	100
1826626	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22045	100
1826636	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22046	100
1826646	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22047	100
1826656	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22048	100
1826666	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22049	100
1826676	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22050	100
1826686	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22051	100
1826696	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22052	100
1826706	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22053	100
1826716	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22054	100
1826726	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22055	100
1826736	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22056	100
1826746	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22057	100
1826756	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22058	100
1826766	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22059	100
1826776	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22060	100
1826786	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22061	100
1826796	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22062	100
1826806	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22063	100
1826816	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22064	100
1826826	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22065	100
1826836	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22066	100
1826846	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22067	100
1826856	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22068	100
1826866	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22069	100
1826876	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22070	100
1826886	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22071	100
1826896	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22072	100
1826906	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22073	100
1826916	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22074	100
1826926	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22075	100
1826936	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22076	100
1826946	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22077	100
1826956	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22078	100
1826966	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22079	100
1826976	CHANNETT	JOHN	ALBERT	CAMBER	22080	100

Go to Fulltext

[57] Abstract:

PURPOSE: To obtain the DNA fragment containing a gene coding diaminopimelic acid decarboxylase from *Brevibacterium-flavum*, and capable of transforming a *Coryne* type bacteria to produce useful products such as L-lysine, etc., in a high efficiency.

CONSTITUTION: A novel DNA fragment expressed by formula, etc., containing a gene coding diaminopimelic acid decarboxylase (EC-4. 1. 1. 20), derived from a *Brevibacterium-flavum* [e.g. *Brevibacterium-flavum* MJ- 233 (FERM-BP-1497), etc.].

The enzyme is obtained as a form of an objective DNA fragment, by culturing *Brevibacterium-flavum* MJ-233 until the logarithmic growth phase, collecting the microbial cells, suspending them in a buffer solution, subjecting them to bacteriolysis with a lysozyme, a protease and a surface active agent, etc., collecting genes from the bacteriolytic solution by a conventional procedure, treating the genes with a restriction enzyme, and cloning a DNA coding diaminopimeric acid decarboxylase.

[51] Int'l Class: C12N01509 C12N00121 C12N01509 C12R00113
C12N00121 C12R00115

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-75579

(43) 公開日 平成7年(1995)3月20日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	7236-4B		
1/21				
// (C 1 2 N 15/09	Z N A	9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			(C 1 2 N 15/ 00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数7 OL (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平5-223502	(71) 出願人	000006057 三菱油化株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22) 出願日	平成5年(1993)9月8日	(72) 発明者	真島 美輪 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
		(72) 発明者	小林 幹 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
		(72) 発明者	湯川 英明 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
		(74) 代理人	弁理士 曾我 道照 (外6名)

(54) 【発明の名称】 ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片およびその利用

(57) 【要約】

【構成】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから得られ、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片、該DNA断片を保有する組換えプラスミド、および該組換えプラスミドにより形質転換されたコリネ型細菌。

【効果】 該DNA断片が導入された組換えプラスミドにより形質転換されたコリネ型細菌を用いることで、従来よりも高効率にL-リジンを生産することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来のジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.20) をコードする遺伝子を含む DNA断片。

【請求項2】 前記プレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) がプレビバクテリウム・フラバム MJ-233である請求項1に記載のDNA断片。

【請求項3】 次のDNA塩基配列：

```

ATGGCTACAG TTGAAATTT CAATGAAC TT CCGCACACG TGTGGCCCG CAATGCCGTG 60
CGCCAAGAAG ACGGCGTTGT CACCGTCGCT GGTGTGCTC TGCTGACCT CGCTGAAGAA 120
TACGGAACCC CACTGTTCTG AGTCGACGAG GACGATTTCC GTTCCCGCTG TCGCGACATG 180
GCTACCGCAT TCGGTGGACC AGGCAATGTG CACTACGCAT CCAAAGCGTT CCTGACCAAG 240
ACCATTCGAC GTTGGGTGA TGAAGAGGGG CTGGCACTGG ACATTGCGTC CATCAATGAA 300
CTGGGCATTG CCTGGCTGC TGGTTTCCCC GCCAGCCGTA TCACCGCGCA CGGCAACAAC 360
AAGGGCGTGG ACTTCTCCG CCGTTGGTT CAAAACGGTG TGGGACACGT GGTGCTGGAC 420
TCCGCACAGG AACTAGAACT GTTGATTAC GTTGCCGCTG GTGAAGGCAA GATCCAGGAC 480
GTGTTGATCC GCGTAAAGCC AGGCATCGAA GCACACACC ACGAGTTCAT CGGCACTAGC 540
CACGAAGACC AGAAGTTCGG ATTCTCCCTG GCATCCGTTT CCGCATTCGA AGCAGCAAAA 600
GCCGCCAACA ACGCAGAAAA CCTGAACCTG GTTGGCCTGC ACTGCCACGT TGGTTCCAG 660
GTGTTGACG CCGAAGGCTT CAAGCTGGCA GCAGAACGCG TGTGGGCCT GTACTCACAG 720
ATCCACAGCG AACTGGGCGT TGCCCTTCTT GAACTGGATC TCGGTGGCGG ATACGGCATT 780
GCCTATACCG CAGCTGAAGA ACCACTCAAC GTCGAGAAG TTGCCTCGA CCTGCTCACC 840
GCAGTCGAA AAATGGCAGC GGAAGTAGGC ATCGACGCAC CAACCGTGCT TGTGAGCCCC 900
GGCCGGGCTA TCGCAGGCC CTCCACCGTG ACCATCTACG AAGTCGGAC CACCAAGAC 960
GTCCACGTAG ACGACGACAA AACCCGCGT TACATCGCG TGGACGGAGG CATGTCCGAC 1020
AACATCGCC CAGCACTCTA CGGCTCCGAA TACGACGCC GCGTAGTATC CCGCTTCGTC 1080
GAAGGAGAAC CAGTAAACAC CCGCATCGT GGTCCCACT GCGAATCCG CGATATCCTG 1140
ATCAACGATG AAATCTACCC ATCTGACATC ACCAGCGCG ACTTCCTTGC ACTCGAGCC 1200
ACCGGCGCAT ACTGCTACGC CATGAGCTCC CGCTACAACG CCTTCACAG GCCCGCCGTC 1260
GTGTCGCTCC GCGCTGGCAG CTCGCGCTC ATGCTGGAC GCGAAACGCT CGACGACATC 1320
CTCTCATTAG AGGCA - 1335

```

で表されるジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.20) をコードする遺伝子を含むDNA断片。

【請求項4】 次のアミノ酸配列：

```

Met Ala Thr Val Glu Asn Phe Asn Glu Leu Pro Ala His Val Trp Pro
1          5          10         15
Arg Asn Ala Val Arg Gln Glu Asp Gly Val Val Thr Val Ala Gly Val
20         25         30
Pro Leu Pro Asp Leu Ala Glu Glu Tyr Gly Thr Pro Leu Phe Val Val
35         40         45
Asp Glu Asp Asp Phe Arg Ser Arg Cys Arg Asp Met Ala Thr Ala Phe
50         55         60
Gly Gly Pro Gly Asn Val His Tyr Ala Ser Lys Ala Phe Leu Thr Lys
65         70         75         80
Thr Ile Ala Arg Trp Val Asp Glu Glu Gly Leu Ala Leu Asp Ile Ala
85         90         95
Ser Ile Asn Glu Leu Gly Ile Ala Leu Ala Ala Gly Phe Pro Ala Ser
100        105        110
Arg Ile Thr Ala His Gly Asn Asn Lys Gly Val Asp Phe Leu Arg Ala
115        120        125
Leu Val Gln Asn Gly Val Gly His Val Val Leu Asp Ser Ala Gln Glu
130        135        140
Leu Glu Leu Leu Asp Tyr Val Ala Ala Gly Glu Gly Lys Ile Gln Asp
145        150        155        160

```

Val Leu Ile Arg Val Lys Pro Gly Ile Glu Ala His Thr His Glu Phe
 165 170 175
 Ile Ala Thr Ser His Glu Asp Gln Lys Phe Gly Phe Ser Leu Ala Ser
 180 185 190
 Gly Ser Ala Phe Glu Ala Ala Lys Ala Ala Asn Asn Ala Glu Asn Leu
 195 200 205
 Asn Leu Val Gly Leu His Cys His Val Gly Ser Gln Val Phe Asp Ala
 210 215 220
 Glu Gly Phe Lys Leu Ala Ala Glu Arg Val Leu Gly Leu Tyr Ser Gln
 225 230 235 240
 Ile His Ser Glu Leu Gly Val Ala Leu Pro Glu Leu Asp Leu Gly Gly
 245 250 255
 Gly Tyr Gly Ile Ala Tyr Thr Ala Ala Glu Glu Pro Leu Asn Val Ala
 260 265 270
 Glu Val Ala Ser Asp Leu Leu Thr Ala Val Gly Lys Met Ala Ala Glu
 275 280 285
 Leu Gly Ile Asp Ala Pro Thr Val Leu Val Glu Pro Gly Arg Ala Ile
 290 295 300
 Ala Gly Pro Ser Thr Val Thr Ile Tyr Glu Val Gly Thr Thr Lys Asp
 305 310 315 320
 Val His Val Asp Asp Asp Lys Thr Arg Arg Tyr Ile Ala Val Asp Gly
 325 330 335
 Gly Met Ser Asp Asn Ile Arg Pro Ala Leu Tyr Gly Ser Glu Tyr Asp
 340 345 350
 Ala Arg Val Val Ser Arg Phe Val Glu Gly Glu Pro Val Asn Thr Arg
 355 360 365
 Ile Val Gly Ser His Cys Glu Ser Gly Asp Ile Leu Ile Asn Asp Glu
 370 375 380
 Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Thr Ser Gly Asp Phe Leu Ala Leu Ala Ala
 385 390 395 400
 Thr Gly Ala Tyr Cys Tyr Ala Met Ser Ser Arg Tyr Asn Ala Phe Thr
 405 410 415
 Arg Pro Ala Val Val Ser Val Arg Ala Gly Ser Ser Arg Leu Met Leu
 420 425 430
 Arg Arg Glu Thr Leu Asp Asp Ile Leu Ser Leu Glu Ala
 435 440 445

で表されるジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.20) をコードする遺伝子を含むDNA断片。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかひとつに記載のDNA断片が導入された組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項1～4のいずれかひとつに記載のDNA断片と、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を保有する組換えプラスミド。

【請求項7】 請求項5～6のいずれかひとつに記載の組換えプラスミドにより形質転換されたコリネ型細菌。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.20) をコードする遺伝子を含むコリネ型細菌由来のDNA断片およびその利用に

関し、より詳しくは、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むブレヴィバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来のDNA断片、該DNA断片を保有する組換えプラスミド、および該プラスミドにより形質転換されたコリネ型細菌に関する。

【0002】

【従来の技術】 ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.20) は、医薬や食品添加物として用いられるL-リジンの生合成に関与する工業的に有用な酵素である。ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子 (J. Mol. Biol., 168, 321-331, 1983 参照)、およびコリネバクテリウム・グルタミカ

ム (*Corynebacterium glutamicum*) 由来の遺伝子 (Mol. Gener. Genet., 212, 105-111, 1988; Mol. Gener. Genet., 212, 112-119, 1988; Mol. Microbiol., 4(11), 1819-1830, 1990 参照) についての報告例はあるものの、本発明者らの知る限りでは、産業上重要な微生物であるブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来のジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子についての報告例は見当たらない。一方、従来提案されている微生物を用いる L-リジンの製造法では、L-リジンの蓄積等に限界があり、新たな観点から遺伝子工学的手法による菌株の改良も含め、L-リジンをより効率的に生成させる方法の提供が強く求められている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、コリネ型細菌に属するブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来のジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて新たな観点から効率的に L-リジンを製造することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記目的を達成すべく鋭意研究を行った結果、コリネ型細菌染色体からジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含む DNA 断片を単離し、該 DNA 断片を適当なベクタープラスミドに導入してコリネ型細菌を形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌が L-リジンの高生産能力を有することを見だし、本発明を完成するに至った。即ち本発明は、(1) ブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来のジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含む DNA 断片、(2) 該 DNA 断片を保有する組換えプラスミド、(3) 該組換えプラスミドにより形質転換されたコリネ型細菌、を提供するものである。本発明の上記 DNA 断片を用いることにより、コリネ型細菌内でジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼを高生産し得るベクタープラスミドを造成することができ、このベクタープラスミドでコリネ型細菌を形質転換することにより、L-リジンを効率的に生産し得る工業的に有用なコリネ型細菌を育種することが可能である。かくして育種されたコリネ型細菌を用いて L-リジンを効率的に製造することができる。以下に、本発明についてさらに詳細に説明する。

【0005】

【本発明の具体的説明】本発明の、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含む DNA 断片 (以下これを「A断片」と略称することがある。) とは、L-リジンの前駆体である meso-ジアミノピメリン酸を脱炭酸して L-リジンを合成する酵素、即ちジアミ

ノピメリン酸デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.20) をコードする遺伝子 DNA を含む DNA 断片を意味する。

【0006】本発明のジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含む DNA 断片はその塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常は該酵素を生産する微生物から単離およびクローニングして取得可能であり、その供給源となる微生物としてはコリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) およびその由来株等が好適に用いられる。これら供給源微生物から A断片を調製するための基本的操作の1例を以下に示す。

【0007】A断片は上記コリネ型細菌、例えばブレビバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体 DNA 上に存在し、その染色体 DNA を適当な制限酵素で切断して生じる切断断片の中から分離、取得することが可能である。まず、ブレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株の培養物から常法により染色体 DNA を抽出し、該染色体 DNA を適当な制限酵素、例えば *Sau3A*I を用いて部分分解する。次に得られた DNA 断片を、適当なマーカー遺伝子を有するベクタープラスミド、例えばカナマイシン耐性遺伝子を有する p HSG 298 (宝酒造製) に常法により挿入する。得られたベクタープラスミドを用い、通常の形質転換法、例えば塩化カルシウム法または電気パルス法等により適当な宿主細菌、例えばジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子が欠損した大腸菌 (*Escherichia coli*) 変異株 CGSC 4345 [エシエリヒア・コリ ジェネテック・ストック・センター (*Escherichia coli* Genetic Stock Center)、デパートメント・オブ・バイオロジー、エール・ユニバーシティ (Department of Biology, Yale University): P.O. Box 6666 New-Haven, CT 06511-74, USA 保存株] を形質転換し、菌体を選択培地上で培養して形質転換株の有する組換えプラスミドのマーカー遺伝子発現の有無により、形質転換株を分離、取得する。得られた形質転換株より、プラスミド DNA を常法、例えばアルカリ SDS 法等により抽出し、適当な制限酵素で切断する。得られた DNA 断片を常法、例えばポリアクリルアミド電気泳動法等により解析することにより、前記プラスミド DNA に挿入されたブレビバクテリウム・フラバム MJ-233 株由来の A断片を確認および取得することができる。

【0008】上記手法により得られる A断片の例としては、上記ブレビバクテリウム・フラバム MJ-233 の染色体 DNA を制限酵素 *Sau3A*I により部分分解して得られる、大きさ約 1.5 kb の DNA 断片を挙げることができる。このジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含む大きさが約 1.5 kb の DNA 断片を各種制限酵素により切断した際の、制限酵素認識部位数および切断断片の大きさを下表 1 に示

す。
【0009】

【表1】

表 1

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (k b)
<u>A</u> cc I	2	0.2, 0.4, 0.9
<u>S</u> ac I	1	0.2, 1.3
<u>S</u> al I	1	0.2, 1.3
<u>P</u> vu II	1	0.6, 0.9
<u>D</u> ra III	1	0.4, 1.1

【0010】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片またはプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。また、「切断断片の大きさ」およびプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシエリヒア・コリのラムダファージ (λ phage) のDNAを制限酵素 Hind IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシエリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ (ϕ x174 phage) のDNAを制限酵素 Hae IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1 k b以上の断片の大きさについては1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1 k bから1 k b未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0011】一方、上記したプレバクテリウム・フラバムJ-233の染色体DNAを制限酵素 Sau 3Aを用いて部分分解することにより得られる大きさが約1.5 k bのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118またはpUC119 (宝酒造製)を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxynucleotide termination method, Sanger, F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p5463, 1977) により決定することができる。このようにして決定した上記大きさが約1.5 k bのDNA断片の塩基配列のオープン・リーディング・フレームの存在から決定したジアミノビメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子は、445個のアミノ酸をコードする1335塩基対から構成されている。その塩基配列を後記配列表の配列番号: 1に示す。

【0012】配列番号: 1に示される塩基配列を包含し

てなる本発明のジアミノビメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のコリネ型細菌染色体DNAから単離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばアプライド・バイオシステムズ社製394型を用いて合成されたものであってもよい。また、配列番号: 1に示される塩基配列を包含してなる本発明のDNA断片は、ジアミノビメリン酸デカルボキシラーゼをコードする機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基で置換されていてもよく、あるいは新たに塩基が挿入されていてもよく、また一部の塩基が欠損または転位していてもよく、これら誘導体のいずれもが、本発明のジアミノビメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。以上に詳述したジアミノビメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含む大きさ約1.5 k bのDNA断片の各種制限酵素による切断点地図を図1に示す。

【0013】本発明のジアミノビメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (A断片) を適当なプラスミドベクター、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも保有するプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でジアミノビメリン酸デカルボキシラーゼを高発現する優れた組換えプラスミドを得ることができる。また、本発明のジアミノビメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターは、コリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターのみならず、コリネ型細菌内でジアミノビメリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子の転写を開始させ得るプロモーターであれば、原核生物に由来する天然または合成塩基配列であっても、その他のいかなる塩基配列であってもよい。

【0014】本発明のA断片を導入することができ、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも保有するプラスミドベクターとしては、例えば、プラスミドpCRY30 (特開平3-210184号公報); プラスミドpCRY21, pCRY2KE, pCRY2KX, pCRY31, pCRY3KEおよびpCRY3KX (特開平2-276579号公報); プラスミドpCR

Y2およびpCRY3 (特開平1-191686号公報); プラスミドpAM330 (特開昭58-67679号公報); プラスミドpHM1519 (特開昭58-77895号公報); プラスミドpAJ655、pAJ611およびpAJ1844 (特開昭58-192900号公報); プラスミドpCG1 (特開昭57-134500号公報); プラスミドpCG2 (特開昭58-35197号公報); プラスミドpCG4およびpCG11 (特開昭57-183799号公報) 等のプラスミドを例示することができる。これらの中でも、コリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA領域およびコリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA領域を保有するプラスミドが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE、pCRY3KX等が好適に用いられる。

【0015】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法の1例を以下に示す。プレバクテリウム・スタチオニス (*Brevibacterium stationis*) IFO12144 (FERM BP-2515) からプラスミドpBY503 (特開平1-95785号公報) DNAを常法により抽出し、これを制限酵素XhoIで処理して、プラスミド複製増殖機能を司る遺伝子を含む大きさが約4.0 kbのDNA断片を切り出す。同様に該プラスミドDNAを制限酵素EcoRIおよびKpnIで処理して、プラスミド安定化機能を司る遺伝子を含む大きさが約2.1 kbのDNA断片を切り出す。得られた2つのDNA断片をプラスミドpHSG298 (宝酒造製) のEcoRI-KpnI部位およびSalI部位にそれぞれ組込むことにより、プラスミドpCRY30を調製することができる。

【0016】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えば、プラスミドベクター中に1箇所だけ存在する制限酵素部位を該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素BamHIで開裂させ、そこに前記ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。

【0017】かくして造成される本発明のA断片をプラスミドpCRY30に導入した組換えプラスミドは、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼの高生産能力を有しておりL-リジンの製造に好適に利用することができる。本発明者らは、このプラスミドを“プラスミドpCRY30-lysA”と命名した。本プラスミドpCRY30-lysAの作製方法については、後記実施例3にて詳細に説明する。上記手法により造成される本発明

のジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを宿主微生物に導入し、該微生物を形質転換して得られる形質転換微生物を用いて安定して効率良くL-リジンを生産することができる。

【0018】本発明による上記組換えプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えば、プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)、プレバクテリウム・フラバムMJ233-AB-41 (FERM BP-1498)、プレバクテリウム・フラバムMJ233-ABT-11 (FERM BP-1500)、プレバクテリウム・フラバムMJ233-ABD-21 (FERM BP-1499) 等が挙げられる。なお、上記 FERM BP-1498 の菌株は FERM BP-1497 の菌株を親株としてD-L- α -アミノ酪酸耐性を積極的に付与されたエタノール酸化性微生物である (特公昭59-28398号公報参照)。また、FERM BP-1500 の菌株は FERM BP-1497 の菌株を親株としたL- α -アミノ酪酸トランスアミナーゼ高活性変異株である (特開昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499 の菌株は FERM BP-1497 の菌株を親株としたD- α -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である (特開昭61-177993号公報参照)。

【0019】上記微生物の他に、プレバクテリウム・アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC 6871、同 ATCC 13745、同 ATCC 13746、プレバクテリウム・デバリカム (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC 4020、プレバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 31830等を宿主微生物として用いることもできる。なお、宿主としてプレバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株の保有するプラスミドpBY502 (特開昭63-36787号公報参照) のために形質転換が困難な場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。プラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠落させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である [バクテリオロジカル・レビュー (Bacteriological Review)、第36巻、361頁、1972年参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の1例を以下に示す。

【0020】宿主菌プレバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度、例えば0.2~50 μ g/ml 濃度のアクリジンオレンジもしくはエチジウムブロミド等を含有する培地に1ml当たり約10菌体の密度で該宿主菌を植菌し、その生育を不完全に阻害しながら約35℃で約24時間培養する。この培養液を希釈して寒天培地に塗布し、約35℃で約2日間培養する。得られたコロニーから各々独立にプラスミド抽出

操作を行ない、プラスミド pBY502 が除去されている株を選抜する。この一連の操作により、プラスミド pBY502 が除去されたプレバクテリウム・フラバム MJ-233 由来株が得られる。

【0021】上記コリネ型細菌への前記組換えプラスミドの形質転換法としては、エシエリヒア・コリ (*E. coli*) およびエルビニア・カロトボラ (*Erwinia carotovora*) について知られているように [エヌ・エム・カルビン (N.M. Calvin) およびビー・シー・ハナワルト (P.C. Hanawalt)、ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (Journal of Bacteriology) 170巻、2796頁、1988年; ケー・イトウ (K. Ito) ら、アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry)、52巻、293頁、1988年 参照]、DNA 受容菌にパルス波を通過する方法 [ワイ・サトウ (Y. Satoh) ら、ジャーナル・オブ・インダストリアル・マイクロバイオロジー (Journal of Industrial Microbiology)、5巻、159頁、1990年] 等を利用することができる。

【0022】上記の方法で形質転換して得られるジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ高産能を有するコリネ型細菌、例えばプレバクテリウム・フラバム MJ-233 由来株の培養方法を、以下に述べる。得られた形質転換コリネ型細菌は、炭素源、窒素源、無機非金属または金属塩、ビタミン類等、該細菌の増殖に必要なかつ十分な栄養成分を含有する培地を用いて、適当な好気、温度、pH 条件の下に培養することができる。培地に含有される栄養成分は、培養の開始時に全て添加することもできるし、また培養の進展に伴い逐次または連続的に添加することもできる。

【0023】培地中の炭素源としては、例えば、グルコース、グリセロール、フルクトース、シュクロース、マルトース、澱粉加水分解物、糖蜜等の炭水化物; コハク酸、フマル酸、酢酸、乳酸等の有機酸; エタノール、メタノール等のアルコール類の中から培養対象細菌が資化可能な炭素源を選択して、単独でまたは組合わせて用いることができる。培養開始時の炭素源濃度は 1~5 容量%であることが好ましく、さらに好ましくは 2~3 容量%である。窒素源としては、例えば、アンモニアまたは塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等の各種無機あるいは有機アンモニウム塩類; 尿素等の他の無機含窒素化合物; グルタミン酸等のアミノ酸類; ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼミノ酸、コーンスチープリカー等の含窒素天然栄養源等を用いることができる。

【0024】無機非金属塩または金属塩としては、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸アンモニウム、硫酸第一鉄、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マンガン、硫酸マンガン等を用いることができる。ビタミン類としてはビオチン、チアミンなどを必

要に応じて用いるが、含窒素天然栄養源の中にはこれらのビタミン類を含有するものがあるので、これをもってビタミン類の代替とすることも可能である。培養は通常、振盪培養、通気攪拌培養等の好気条件下で行なう。培養温度は一般に約 20~40℃、好ましくは約 25~35℃に、培地の pH は 5~10、好ましくは 7~8 の中性付近に、それぞれ維持することが好ましい。培地の pH 調整は、適当な酸またはアルカリを添加して行うことができる。培養期間は通常 1~7 日間とすることができる。培養菌体は、培養終了後に遠心分離、膜分離等の適当な手段で培養液から分離回収することができる。

【0025】上記手法で得られる培養物または培養物から得られる菌体を用いて、発酵法または酵素法により L-リジンを製造することができる。次に実施例により本発明をさらに具体的に説明する。当然ながら、下記実施例は本発明について具体的な認識を得る一助としてのみ挙げたものであり、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

【0026】

【実施例】

実施例 1

ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むプレバクテリウム・フラバム MJ-233 由来の DNA 断片 (A 断片) のクローン化

(A) プレバクテリウム・フラバム MJ-233 の全 DNA の抽出

半合成培地 A 培地 [組成: 尿素 2 g、硫酸アンモニウム 7 g、リン酸一カリウム 0.5 g、リン酸二カリウム 0.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、 $MnSO_4 \cdot 4 \sim 6H_2O$ 6 mg、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 6 mg、酵母エキス 2.5 g、カゼミノ酸 5 g、ビオチン 20 μg 、塩酸チアミン 100 μg 、グルコース 20 g を蒸留水に溶解して 1 l とする] 1 l を用いてプレバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497) を対数増殖期後期まで培養し、培養菌体を回収した。得られた菌体を、リゾチームを 10 mg/ml の濃度で含有する溶液 [組成: 10 mM NaCl、20 mM トリス緩衝液 (pH 8.0)、1 mM EDTA \cdot 2Na] 15 ml に懸濁した。続いて最終濃度 100 $\mu g/ml$ 量のプロテナーゼ K を添加し、37℃で 1 時間インキュベートした。さらに最終濃度 0.5% 量のドデシル硫酸ナトリウムを添加し、50℃で 6 時間インキュベートして溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液 (1:1, v/v) を添加し、室温で 10 分間穏やかに振盪した後、全量を 10~12℃で 20 分間、5,000 $\times g$ の遠心分離にかけ、その上清画分を分取した。酢酸ナトリウムをその最終濃度が 0.3 M となるように該画分に添加し、次いで 2 倍量のエタノールを穏やかに添加した。水層とエタノール層との間に存在する DNA をガラス棒で撪め取り、これを 70% エタノールで洗浄

した後に風乾した。得られたDNAは、溶液〔組成；10mM トリス緩衝液 (pH7.5)、1mMEDTA・2Na〕5mlを添加して4℃で一晩静置した後、実験に供した。

【0027】(B) ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含む組換えプラスミドの創製および選抜

前記(A)項で得られたプレビパクテリウム・フラバム MJ-233の全DNA溶液 90μlを、1 unit の制限酵素Sau3AIと37℃で15分間反応させて部分分解した。該分解物及びカナマイシン耐性遺伝子を有するクローニングベクターpHSG298(宝酒造製)の制限酵素SalI分解物の5'突出末端の内側の2bpを相補的なデオキシヌクレオチドでうめた。得られたそれぞれのDNA分解物溶液を65℃で10分間加熱して制限酵素を失活させた後に混合し、該液に、それぞれの最終濃度が50mM トリス緩衝液(pH7.6)、10mMジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂、およびT4DNAリガーゼ 1 unit となるように各成分を添加し、4℃で15時間反応させて、DNAを結合させた。

【0028】上記手順により得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム法〔J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)〕により前記ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ欠損大腸菌変異株、エシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) CGSG4345 (lysA) [(O) 内はジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ遺伝子型を示す]を形質転換した。形質転換した前記エシエリヒア・コリCGSG4345 (lysA) 株を、カナマイシン 50mgを含有する選択培地〔組成；K₂HPO₄ 7g、KH₂PO₄ 2g、(NH₄)₂SO₄ 1g、MgSO₄・7H₂O 0.1g、グルコース 20gおよび寒天 16gを蒸留水 1lに溶解する〕に塗抹した。この培地上に生育したジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むプラスミドを保持する菌株を、常法により液体培養して培養液よりプラスミドDNAを抽出した。抽出したプラスミドを制限酵素により分解し、得られた分解物をアガロースゲル電気泳動に供した結果、プラスミドpHSG298の大きさ2.7kbのDNA断片に加え、大きさ約1.5kbの挿入DNA断片が認められた。本発明者らは、このプラスミドを“プラスミドpH

SG298-lysA”と命名した。

【0029】(C) ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含むDNA断片(A断片)のサブクローニング

前記(B)で得られたプラスミドpHSG298-lysAに含まれる挿入DNA断片を下記手順にてプラスミドpUC118(宝酒造製)にサブクローニングした。前記プラスミドpHSG298-lysAを制限酵素BamHIおよび制限酵素HindIIIと反応させて得られる分解物と、プラスミドpUC118を制限酵素BamHIおよび制限酵素HindIIIと反応させて得られる分解物とを混合した。この混合液を65℃で10分間加熱して酵素を失活させた後に、それぞれの最終濃度が50mM トリス緩衝液 (pH7.6)、10mM ジチオスレイトール、1mM ATP、10mM MgCl₂、およびT4DNAリガーゼ 1 unit となるように各成分を添加し、12℃で15時間反応させて、DNA分解物を結合させた。

【0030】得られたプラスミド混液を用いて、塩化カルシウム法 (J. Mol. Biol., 53, 159, 1970)により前記エシエリヒア・コリCGSG4345株を形質転換し、カナマイシンを50mg含有する選択培地〔組成；K₂HPO₄ 7g、KH₂PO₄ 2g、(NH₄)₂SO₄ 1g、MgSO₄・7H₂O 0.1g、グルコース 20gおよび寒天 16gを蒸留水に溶解して1lとする〕に塗抹した。この培地上に生育した菌株を常法により液体培養し、該培養液から常法によりプラスミドDNAを抽出した。抽出したプラスミドを制限酵素により分解し、得られた分解物をアガロースゲル電気泳動に供した結果、プラスミドpUC118の大きさ約3.2kbのDNA断片に加え、大きさ約1.5kbの挿入DNA断片が認められた。確認された大きさ約1.5kbの挿入DNA断片を各種の制限酵素で切断したときの制限酵素認識部位数および切断断片の大きさは前記表1に示したと同一であった。このDNA断片の制限酵素切断点地図を図1に示す。また、上記手法により得られたプラスミドを各種制限酵素で切断したときの制限酵素認識部位数および切断断片の大きさを下記表2に示す。

【0031】

【表2】

表 2

プラスミド pUC118-lysA

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
<u>A</u> ccI	3	0.9, 3.8
<u>S</u> acI	2	1.3, 3.4
<u>P</u> vuII	3	0.6, 0.9, 3.2
<u>S</u> alI	1	4.7

【0032】上記表2に示した制限酵素の切断断片により特徴付けられるプラスミドを、“プラスミド pUC118-lysA”と命名した。以上により、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含む大きさ約1.5 kbのDNA断片 (BamHI-HindIII断片; A断片)を取得した。

【0033】実施例2

ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子のDNA塩基配列の決定

実施例1 (C) 項で得たジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含む大きさ約1.5 kbのDNA断片の塩基配列を、プラスミド pUC118またはpUC119を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxynucleotide chain termination 法) により、図2に示した戦略図に従って決定した。得られた塩基配列中のオープン・リーディング・フレームの存在からジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子は後記配列表の配列番号: 1に示す塩基配列を有する445個のアミノ酸をコードする1335塩基対より構成されていることが判明した。

【0034】実施例3

プラスミド pCRY30-lysAの作成およびコリネ型細菌への導入

(A) プラスミド pCRY30-lysAの調製

実施例1 (B) で得られたプラスミド pHSG298-lysA 5 µgを、各々 5 units の制限酵素 BamHIおよびHindIIIと、37℃で1時間反応させて分解し、そのDNA分解物の末端部位を常法により処理して平滑末端とした。このDNA分解物とBamHIリンカー (宝酒造製) 1 µgとを混合した。混合液を65℃で10分間加熱して酵素を失活させた後に、それぞれの最終濃度が 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl₂、およびT4 DNAリガーゼ 1 unit となるように各成分を添加し、12℃で15時間反応させて、結合させた。

【0035】得られた連結DNAを制限酵素 BamHI 3 units と37℃で1時間反応させて得られたDNA分解物と、特開3-210184号公報に記載の方法に基づいて調製したプラスミド pCRY30 1 µgを制限酵素 B

amHI 1 unit と37℃で1時間反応させて得られたDNA分解物とを混合し、この混合液を65℃で10分間加熱して酵素を失活させた後に、それぞれの最終濃度が 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM MgCl₂、およびT4 DNAリガーゼ 1 unit となるように各成分を添加し、12℃で15時間反応させて、DNA分解物を結合させた。得られたプラスミド混液を用いて、前記実施例1 (B) に記載の方法により、前記エシェリヒア・コリCGSG4345株を形質転換し、カナマイシンを50 µg/mlの濃度で含有する選択培地 [組成: K₂HPO₄ 7 g、KH₂PO₄ 2 g、(NH₄)₂SO₄ 1 g、MgSO₄·7H₂O 0.1 g、グルコース 20 gおよび寒天 16 gを蒸留水に溶解して1 lとする] に塗抹した。この培地上に生育した菌株を常法により液体培養し、該培養液から常法によりプラスミドDNAを抽出した。抽出したプラスミドを制限酵素により分解し、得られた分解物をアガロースゲル電気泳動に供した結果、プラスミド pCRY30の大きさ約8.6 kbのDNA断片に加え、大きさ約1.5 kbの挿入DNA断片が認められた。

【0036】(B) プラスミド pCRY30-lysAのコリネ型細菌への導入

上記の如く調整されたプラスミドDNAを、電気パルス法を用いて次のとおりコリネ型細菌へ形質転換した。プレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) プラスミド除去株を100 mlの前記A培地对数増殖期初期まで培養した後、ペニシリンGを1 unit/ml となるように添加してさらに2時間振盪培養した。培養菌体を遠心分離にて集め、20 mlのバース用溶液 [組成: 272 mM シュークロース、7 mM KH₂PO₄、1 mM MgCl₂; pH 7.4] にて洗浄した。再度、遠心分離にて菌体を集め、5 mlのバース用溶液に懸濁し、0.75 mlの細胞と前記 (A) で得られたプラスミド溶液50 µlとを混合し、水中にて20分間静置した。ジーンパルサー (バイオラ社製) を用いて、2500 ボルト、25 µFDに設定し、パルスを加えて水中に20分間静置した。全量を3 mlの前記A培地に移し、30℃にて1時間培養後、カナマイシン 15 µg/ml (最終濃度) を含む前記A寒天培地に植菌して3

0℃で2～3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、常法によりプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断し、得られた切断断片の大きさを

測定した。その結果を下記表3に示す。

【0037】

【表3】

表 3

プラスミドpCRY30-lysA

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
<u>Bam</u> HI	2	1.5, 8.6
<u>Eco</u> RI	1	10.1
<u>Kpn</u> I	1	10.1
<u>Sac</u> I	2	2.0, 8.1
<u>Xba</u> I	1	10.1
<u>Xho</u> I	1	10.1

【0038】上記表3に示した制限酵素の切断断片により特徴付けられるプラスミドを、“プラスミドpCRY30-lysA”、該プラスミドを保持する菌株を“プレバクテリウム・フラバムMJ233-lysA”とそれぞれ命名した。上記表3から明らかな如く、前記プラスミドpCRY30-lysAを制限酵素BamHIで切断することにより、プラスミドpHSG298に由来する大きさ8.6kbのDNA断片に加えて、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含む大きさ約1.5kbのDNA断片が確認された。なお、複合プラスミドpCRY30-lysAにより形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-lysAは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に、平成5年8月6日付けで受託番号：FERM P-13789 として寄託されている。

【0039】実施例4

プラスミドpCRY30-lysAの安定性の確認
前記A培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理した後、この培地に実施例3で得たプレバクテリウム・フラバムMJ233-lysAを植菌し、30℃で24時間の振盪培養を行った。次いで、同様にしてA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注して120℃で15分間滅菌した培地に、培地1ml当たり50細胞の密度で植菌し、再度30℃で24時間の振盪培養を行った。培養物を遠心分離して菌体を回収し、回収した菌体を洗浄した。得られた菌体を、カナマイシンを15 μg/mlの濃度で添加した平板A培地およびカナマイシン無添加の平板A培地に一定量塗抹し、30℃で1日培養した後、生育したコロニーの数を計測した。また、カナマイシン無添加のA培地上に生育したコロニーの菌株については、カナマイシン添加A培地上での生育の可否も調査した。その結果、カナマイシン添加A培地および無添加A培地における生育コロニー数は同数であり、さらにカナマイシン無添加A培地上に生育したコロニーの菌株は全

てカナマイシン添加A培地上に生育可能であった。これにより、本発明のプラスミドpCRY30-lysAが高度の安定性を有することが確認された。

【0040】実施例5

ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼの酵素活性測定

(A) ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ活性測定用粗酵素液の調製

培地 [組成：尿素 0.4%、硫酸アンモニウム 1.4%、リン酸一カリウム0.05%、リン酸二カリウム0.05%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、CaCl₂・2H₂O 2ppm、FeSO₄・7H₂O 2ppm、MnSO₄・4~6H₂O 2ppm、ZnSO₄・7H₂O 2ppm、NaCl 2ppm、ビオチン 200 μg/l、塩酸チアミン 100 μg/l、カザミノ酸 0.1%、酵母エキス 0.1%を蒸留水に溶解する] 100mlを500ml容三角フラスコに分注して滅菌（滅菌後pH7.0）した後、プレバクテリウム・フラバムMJ233-lysAを植菌した。次いで、5g/l

（最終濃度）のグルコースを無菌的に添加し、30℃で2日間振盪培養を行った。次に、本培養培地 [組成：グルコース 5%g、硫酸アンモニウム 2.3%、リン酸一カリウム 0.05%、リン酸二カリウム 0.05%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、FeSO₄・7H₂O 20ppm、MnSO₄・4~6H₂O 20ppm、ビオチン 200 μg/l、塩酸チアミン 100 μg/l、カザミノ酸 0.3%、酵母エキス 0.3%を蒸留水に溶解する] 1000mlを2l容通気攪拌槽に仕込み、120℃で20分間滅菌した後、この槽に前記振盪培養により得られた培養物 20mlを添加し、回転数1000rpm、通気量1vvm、温度33℃、培地のpH7.6の培養条件下で24時間培養を行った。培養終了後、培養物 500mlを遠心分離にかけて培養菌体を回収した。得られた菌体を脱塩蒸留水にて2回洗浄した後、該菌体を0.1Mリン酸緩衝液（pH6.8）3~5mlに懸濁し、これを超音波処理（3分間単位で3回、処

理温度-10℃)して菌体を破碎した。菌体を破碎した後、破碎液を4℃で20分間、6,000rpmの遠心分離に供し、その上澄画分を分取した。得られた上澄液、即ち菌体抽出液を粗酵素液としてジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ活性の測定に供した。

【0041】 (B) ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼの酵素活性測定

リン酸カリウム緩衝液(pH7.6)に上記(A)で得た粗酵素液を10容量%の割合で、基質であるジアミノピメリン酸を1mg/mlの濃度で、それぞれ添加してジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ活性測定用反応液(pH7.6)とした。この反応液を33℃で3時間反応させた後で液体クロマトグラフィーに供し、生成したL-リジンの量を測定した。測定の結果、反応液中におけるL-リジン生成量は15nmol/min/mgであった。また、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233(FERM BP-1497)を上記(A)と同一条件にて培養して粗酵素液を調製し、その粗酵素液を上記と同一条件にて基質と反応させて、生成したL-リジンの量を測定した。測定の結果、L-リジンの生成量は7nmol/min/mgであつ

配列

```

ATG GCT ACA GTT GAA AAT TTC AAT GAA CTT CCC GCA CAC GTG TGG CCC 48
Met Ala Thr Val Glu Asn Phe Asn Glu Leu Pro Ala His Val Trp Pro
1 5 10 15
CGC AAT GCC GTG CGC CAA GAA GAC GGC GTT GTC ACC GTC GCT GGT GTG 96
Arg Asn Ala Val Arg Gln Glu Asp Gly Val Val Thr Val Ala Gly Val
20 25 30
CCT CTG CCT GAC CTC GCT GAA GAA TAC GGA ACC CCA CTG TTC GTA GTC 144
Pro Leu Pro Asp Leu Ala Glu Tyr Gly Thr Pro Leu Phe Val Val
35 40 45
GAC GAG GAC GAT TTC CGT TOC CGC TGT CGC GAC ATG GCT ACC GCA TTC 192
Asp Glu Asp Asp Phe Arg Ser Arg Cys Arg Asp Met Ala Thr Ala Phe
50 55 60
GGT GGA CCA GGC AAT GTG CAC TAC GCA TCC AAA GCG TTC CTG ACC AAG 240
Gly Gly Pro Gly Asn Val His Tyr Ala Ser Lys Ala Phe Leu Thr Lys
65 70 75 80
ACC ATT GCA CGT TGG GTT GAT GAA GAG GGG CTG GCA CTG GAC ATT GCG 288
Thr Ile Ala Arg Trp Val Asp Glu Glu Gly Leu Ala Leu Asp Ile Ala
85 90 95
TCC ATC AAT GAA CTG GGC ATT GCC CTG GCT GCT GGT TTC CCC GCC AGC 336
Ser Ile Asn Glu Leu Gly Ile Ala Leu Ala Ala Gly Phe Pro Ala Ser
100 105 110
CGT ATC ACC GCG CAC GGC AAC AAC AAG GGC GTG GAC TTC CTC GCG GCG 384
Arg Ile Thr Ala His Gly Asn Asn Lys Gly Val Asp Phe Leu Arg Ala
115 120 125
TTG GTT CAA AAC GGT GTG GGA CAC GTG GTG CTG GAC TCC GCA CAG GAA 432
Leu Val Gln Asn Gly Val Gly His Val Val Leu Asp Ser Ala Gln Glu
130 135 140
CTA GAA CTG TTG GAT TAC GTT GCC GCT GGT GAA GGC AAG ATC CAG GAC 480
Leu Glu Leu Leu Asp Tyr Val Ala Ala Gly Glu Gly Lys Ile Gln Asp

```

た。以上の結果から、本発明によるジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードするコリネ型細菌に由来する遺伝子を含むDNA断片が導入されたプラスミドにより形質転換されたコリネ型細菌は、従来に比べて効率的にL-リジンを生産し得ることが認められた。

【0042】

【配列表】

配列番号: 1
 配列の長さ: 1335
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 二本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: 染色体 DNA
 起源
 生物名: プレビバクテリウム フラバム
 株名: MJ-233
 配列の特徴
 特徴を表す記号: CDS
 存在位置: 1-1335
 特徴を決定した方法: E

145	150	155	160	
GTG TTG ATC CGC GTA AAG CCA GGC ATC GAA GCA CAC ACC CAC GAG TTC	528			
Val Leu Ile Arg Val Lys Pro Gly Ile Glu Ala His Thr His Glu Phe				
165	170	175		
ATC GCC ACT AGC CAC GAA GAC CAG AAG TTC GGA TTC TCC CTG GCA TCC	576			
Ile Ala Thr Ser His Glu Asp Gln Lys Phe Gly Phe Ser Leu Ala Ser				
180	185	190		
GGT TCC GCA TTC GAA GCA GCA AAA GCC GCC AAC AAC GCA GAA AAC CTG	624			
Gly Ser Ala Phe Glu Ala Ala Lys Ala Ala Asn Asn Ala Glu Asn Leu				
195	200	205		
AAC CTG GTT GGC CTG CAC TGC CAC GTT GGT TCC CAG GTG TTC GAC GCC	672			
Asn Leu Val Gly Leu His Cys His Val Gly Ser Gln Val Phe Asn Ala				
210	215	220		
GAA GGC TTC AAG CTG GCA GCA GAA CGC GTG TTG GGC CTG TAC TCA CAG	720			
Glu Gly Phe Lys Leu Ala Ala Glu Arg Val Leu Gly Leu Tyr Ser Gln				
225	230	235	240	
ATC CAC AGC GAA CTG GGC GTT GCC CTT CCT GAA CTG GAT CTC GGT GGC	768			
Ile His Ser Glu Leu Gly Val Ala Leu Pro Glu Leu Asp Leu Gly Gly				
245	250	255		
GGA TAC GGC ATT GCC TAT ACC GCA GCT GAA GAA CCA CTC AAC GTC GCA	816			
Gly Tyr Gly Ile Ala Tyr Thr Ala Ala Glu Glu Pro Leu Asn Val Ala				
260	265	270		
GAA GTT GCC TCC GAC CTG CTC ACC GCA GTC GGA AAA ATG GCA GCG GAA	864			
Glu Val Ala Ser Asp Leu Leu Thr Ala Val Gly Lys Met Ala Ala Glu				
275	280	285		
CTA GGC ATC GAC GCA CCA ACC GTG CTT GTT GAG CCC GGC CGC GCT ATC	912			
Leu Gly Ile Asp Ala Pro Thr Val Leu Val Glu Pro Gly Arg Ala Ile				
290	295	300		
GCA GGC CCC TCC ACC GTG ACC ATC TAC GAA GTC GGC ACC ACC AAA GAC	960			
Ala Gly Pro Ser Thr Val Thr Ile Tyr Glu Val Gly Thr Thr Lys Asp				
305	310	315	320	
GTC CAC GTA GAC GAC GAC AAA ACC CGC CGT TAC ATC GCC GTG GAC GGA	1008			
Val His Val Asp Asp Asp Lys Thr Arg Arg Tyr Ile Ala Val Asp Gly				
325	330	335		
GGC ATG TCC GAC AAC ATC CGC CCA GCA CTC TAC GGC TCC GAA TAC GAC	1056			
Gly Met Ser Asp Asn Ile Arg Pro Ala Leu Tyr Gly Ser Glu Tyr Asp				
340	345	350		
GCC CGC GTA GTA TCC CGC TTC GTC GAA GGA GAA CCA GTA AAC ACC CGC	1104			
Ala Arg Val Val Ser Arg Phe Val Glu Gly Glu Pro Val Asn Thr Arg				
355	360	365		
ATC GTG GGC TCC CAC TGC GAA TCC GGC GAT ATC CTG ATC AAC GAT GAA	1152			
Ile Val Gly Ser His Cys Glu Ser Gly Asp Ile Leu Ile Asn Asp Glu				
370	375	380		
ATC TAC CCA TCT GAC ATC ACC AGC GGC GAC TTC CTT GCA CTC GCA GCC	1200			
Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Thr Ser Gly Asp Phe Leu Ala Leu Ala Ala				
385	390	395	400	
ACC GGC GCA TAC TGC TAC GCC ATG AGC TCC CGC TAC AAC GCC TTC ACA	1248			
Thr Gly Ala Tyr Cys Tyr Ala Met Ser Ser Arg Tyr Asn Ala Phe Thr				
405	410	415		
CGG CCC GCC GTC GTG TCC GTC CGC GCT GGC AGC TCC CGC CTC ATG CTG	1296			

Arg Pro Ala Val Val Ser Val Arg Ala Gly Ser Ser Arg Leu Met Leu
 420 425 430
 CGA CGC GAA ACG CTC GAC GAC ATC CTC TCA TTA GAG GCA 1335
 Arg Arg Glu Thr Leu Asp Asp Ile Leu Ser Leu Glu Ala
 435 440 445

【図面の簡単な説明】

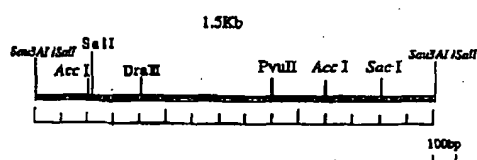
【図1】本発明のジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を含む大きさ約1.5 kbのDNA断片の制限酵素による切断点地図である。

【図2】本発明のジアミノピメリン酸デカルボキシラー

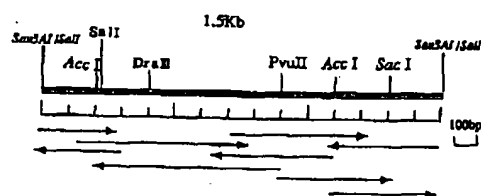
ゼをコードする遺伝子を含む大きさ約1.5 kbのDNA断片の塩基配列決定のための戦略図である。

【図3】本発明のプラスミドpCRY30-lysAの制限酵素による切断点地図である。

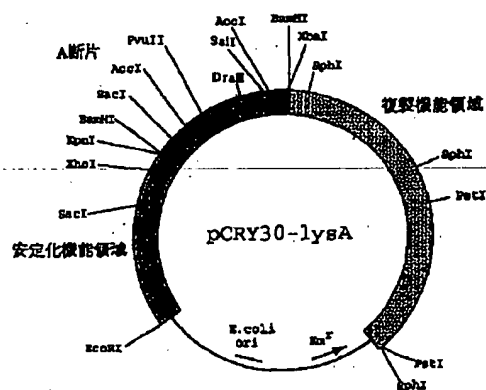
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:15)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:13)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.